

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
11 juillet 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 02/053583 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C07K 7/06,  
7/08, A61K 47/48, C12N 15/85

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/00016

(22) Date de dépôt international : 3 janvier 2002 (03.01.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01/00043 3 janvier 2001 (03.01.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
SYNT:EM [FR/FR]; Parc Scientifique Georges Besse,  
F-30000 Nîmes (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : TEM-  
SAMANI, Jamal [FR/FR]; 370, rue Etienne Ozi, F-30900  
Nîmes (FR). CLAIR, Philippe [FR/FR]; 798, rue de  
Bouillargues, F-30000 Nîmes (FR).

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breesé-Majerowicz,  
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: AMPHIPATHIC PEPTIDES AND THEIR USE FOR TRANSFERRING SUBSTANCES OF INTEREST INTO CELLS

A2 (54) Titre : PEPTIDES AMPHIPATHIQUES ET LEUR UTILISATION POUR TRANSFERER DES SUBSTANCES D'INTERET  
DANS LES CELLULES

WO 02/053583 A2 (57) Abstract: The invention concerns a peptide capable of transferring a substance of interest bearing negative charges inside  
cells and/or inside cell nuclei, characterised in that said peptide corresponds to the following formula: (RLLR)<sub>p</sub>(L)<sub>n</sub>(R)<sub>n</sub>, wherein:  
L represents leucine, R represents arginine, p is an integer ranging between 2 and 4, n is 1 or 2. The invention also concerns a  
composition comprising said peptide and a substance of interest, more particularly a nucleic acid molecule.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un peptide capable de transférer une substance d'intérêt portant des charges négatives  
à l'intérieur des cellules et/ou à l'intérieur du noyau des cellules, caractérisé en ce que ledit peptide répond à la formule suivante:  
(RLLR)<sub>p</sub>(L)<sub>n</sub>(R)<sub>n</sub>, dans laquelle: L représente la leucine, R représente l'arginine, p est un nombre entier compris entre 2 et 4, n est  
1 ou 2. L'invention concerne aussi une composition comprenant ledit peptide et une substance d'intérêt plus particulièrement une  
molécule d'acide nucléique.

PEPTIDES AMPHIPATHIQUES ET LEUR UTILISATION  
POUR LE TRANSFERT DE SUBSTANCES D'INTÉRÊT DANS LES  
CELLULES.

La présente invention concerne des peptides amphipathiques et leur utilisation dans le domaine du transfert de substances d'intérêt, plus particulièrement de molécules d'acide nucléique, dans les cellules.

Le transfert de séquences d'acides nucléiques dans les cellules constitue l'objectif majeur des protocoles de thérapie génique à intérêt thérapeutique visant la guérison de maladies graves, comme les déficiences géniques létales, les cancers et les maladies infectieuses.

L'un des aspects essentiels du transfert de séquences d'acides nucléiques dans les cellules est la pénétration desdites séquences, jusqu'à leur cible finale. Celle-ci peut-être le noyau pour de l'ADN plasmidique, et/ou le cytoplasme pour des oligonucléotides.

Les acides nucléiques sont des molécules hydrophiles de grande taille. A titre d'exemple, un plasmide de 6 kilobases représente  $4.10^6$  daltons. Il ne s'agit donc pas de molécules propices au passage des membranes cellulaires, et le transfert des séquences d'acides nucléiques constitue un problème technique majeur à la mise en œuvre des méthodes de thérapie génique. De nombreuses compositions utiles pour transfecter efficacement les cellules eucaryotes avec un matériel génétique sélectionné ont été décrites dans l'art antérieur.

Parmi ces compositions, la présente invention s'intéresse tout particulièrement à celles comprenant des vecteurs de transfection. Il existe essentiellement deux grands types de vecteurs :

- les vecteurs de transfection naturels, tels que les virus (les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés, les virus herpes-simplex) qui sont efficaces mais qui présentent des limites d'utilisation du fait d'une non-spécificité tissulaire et de risques potentiels de toxicité qui nécessitent de mettre en place des infrastructures cliniques coûteuses.

- Les vecteurs synthétiques, du type liposomes, lipides cationiques, etc., capables de transférer les acides nucléiques dans les cellules eucaryotes de manière plus ou moins toxique.

Ces vecteurs synthétiques doivent présenter essentiellement trois fonctions : (i) condenser l'ADN à transfecter, (ii) promouvoir sa fixation cellulaire et (iii) permettre le passage de l'ADN à travers la membrane cellulaire et éventuellement aussi son passage dans le compartiment nucléaire. Le but de la présente invention est d'offrir un nouveau système de vectorisation présentant ces trois fonctions de manière optimale et ne présentant pas les inconvénients des vecteurs viraux.

Les travaux de recherche réalisés par la Demanderesse sur des séquences peptidiques capables de transférer *in vitro* ou *in vivo* des substances d'intérêt et tout particulièrement des molécules d'acide nucléique, lui ont permis de mettre au point des peptides de transfection dérivant de peptides amphipathiques. La Demanderesse a en effet démontré que ces séquences peptidiques cationiques pouvaient former des interactions ioniques avec les groupements phosphates des acides nucléiques et que ces complexes étaient capables de pénétrer dans les cellules.

On entend par peptide amphipathique, des peptides qui présente un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile. De tels peptides constitués essentiellement d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes ont notamment décrits dans la demande de brevet français publiée sous le No. 2 715 847.

L'invention a donc pour objet un peptide capable de transférer une substance d'intérêt portant des charges négatives à l'intérieur des cellules et/ou à l'intérieur du noyau des cellules, caractérisé en ce que ledit peptide est un peptide amphipathique d'environ 10 à 30, de préférence de 15 à 25, acides aminés et répondant à la formule suivante :

$(L)_m(R)_n(L)_n(R)_n(L)_m$ , dans laquelle :

L représente la leucine,

R représente l'arginine,

m est un nombre entier compris entre 0 et 2,

n est 1 ou 2.

Des peptides préférés selon l'invention répondent à la formule suivante :

$(RLLR)_p(L)_n(R)_n$ , dans laquelle :

L représente la leucine,

R représente l'arginine,

p est un nombre entier compris entre 2 et 4,

n est 1 ou 2.

Un peptide tout préféré selon l'invention répond à la formule suivante représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO.1 :  
RLLRRLRLRLRLRLRR.

L'invention a également pour objet des vecteurs capables de transporter *in vitro* ou *in vivo* une substance d'intérêt portant des charges négatives à l'intérieur des cellules et/ou à l'intérieur du noyau des cellules, ledit vecteur étant constitué d'au moins un peptide décrit précédemment couplé à au moins un composé présentant une affinité pour les membranes cellulaires ou capable de condenser la substance d'intérêt portant des charges négatives.

L'invention envisage tout particulièrement à titre de composé capable de condenser une substance

d'intérêt portant des charges négatives comme un acide nucléique, un groupe polylysine comprenant environ au moins 5 et jusqu'à 25 résidus de lysine.

5 L'invention envisage tout particulièrement à titre de composé présentant une affinité pour les membranes cellulaires, une chaîne d'acide gras, saturé ou insaturé, comme par exemple le palmitoyle.

10 Dans les vecteurs de l'invention, le groupe polylysine ou le reste d'acide gras peut être couplé à l'extrémité N ou C-terminale du peptide, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras de liaison.

15 Les peptides de l'invention et lesdits peptides couplés à un groupe polylysine peuvent être préparés par synthèse chimique ou par des technique d'expression génétique. Le couplage des composés du type acide gras sur un peptide de l'invention peut être réalisé par des réactions chimiques connues de l'homme du métier.

20 L'invention a encore pour objet des compositions comprenant un peptide ou un vecteur comme décrit précédemment et une substance d'intérêt portant des charges négatives. Avantageusement, le rapport :

Charges positives du peptide ou du vecteur

---

25

Charges négatives de la substance d'intérêt  
dans ladite composition, est égal ou supérieur à 1.

30 Ainsi, plus l'acide nucléique est long, plus le nombre de charges positives apportées par le peptide doit être élevé pour obtenir un effet maximum.

35 Ces compositions sont utiles pour la préparation de compositions pharmaceutiques, cosmétiques ou de diagnostic selon la nature de la substance d'intérêt. En effet, les peptides de l'invention sont remarquables en ce qu'ils sont capables de s'associer par des liaisons de type

ionique avec une grande variété de substance d'intérêt et de transporter celles-ci dans les cellules.

Ainsi, la substance d'intérêt portant des charges négatives peut être tout type d'entité chimique ou biologique portant des charges négatives et dont la charge globale peut être positive, négative ou neutre. Il peut s'agir de substances thérapeutiques, cosmétiques, alimentaire ou de diagnostic. L'invention s'intéresse notamment à la vectorisation de protéines et tout particulièrement au transfert de molécules d'acide nucléique dans le cytoplasme et/ou le noyau des cellules.

On entend par molécule d'acide nucléique tant des molécules d'ADN que d'ARN. Il peut s'agir bien-entendu de gènes ou de parties de gène, éventuellement insérés dans un plasmide et placés sous le contrôle de séquences d'expression adaptées à l'hôte transfecté. Ces gènes ou parties de gène codent des protéines thérapeutiques. Il peut aussi s'agir de courtes séquences d'acide nucléique, comme des oligonucléotides ou des ribozymes, utiles dans des stratégies de thérapie génique antisens.

Les peptides, vecteurs et compositions de l'invention sont utiles pour transporter *in vivo* ou *in vitro* des substances d'intérêt et tout particulièrement des acides nucléiques dans des cellules, notamment eucaryotes. *In vitro*, ils peuvent permettre de transférer des acides nucléiques ou des protéines dans des lignées cellulaires spécifiques, par exemple dans le but d'exprimer une protéine ou d'inhiber sa production. Ils peuvent être utilisés pour l'administration directe de l'acide nucléique ou de la protéine dans un organisme. Ils peuvent être également utilisés *ex vivo* pour le transfert de l'acide nucléique ou de la protéine dans une cellule spécifique pour lui conférer une nouvelle propriété avant de la réadministrer à un organisme. L'invention a donc également pour objet ces cellules comprenant des peptides, vecteurs et compositions décrits précédemment. Il s'agit tout

particulièrement de cellules transfectées au moyen d'un peptide ou d'un vecteur de l'invention. Ces cellules sont obtenues soient *in vitro* par incubation dans des conditions adéquates desdites cellules avec une composition selon l'invention, soit *in vivo* en administrant, par tout moyen approprié, lesdites compositions à un organisme ou partie d'organisme. Les compositions de l'invention peuvent être utilisées libres ou incorporées dans des particules ou nanoparticules comme des liposomes.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent dans lesquels il sera fait référence à la figure 1 qui représente les migrations d'ADN plasmidique obtenues sur un gel de retardement en fonction de la quantité de peptide associée audit ADN.

#### I - CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

##### 1) Peptides.

Les peptides préparés et utilisés pour la transfection dans le cadre de la présente invention sont donnés dans le tableau 1.

Tableau 1

Peptide	PM	Séquence	SEQ ID NO.
No.1	2508	RLLRRLRLRLRLRLRR	SEQ ID NO.1
No.2	3323	KKKKKKKKRLLRRLRLRLRLRR	SEQ ID NO.2
No.3	2876	Palm-Orn(Palm)Ahx-RLLRRLRLRLRLRLRR	SEQ ID NO.1

En ce qui concerne la synthèse du peptide N°3, le peptide H-Orn-Ahx-RLLRRLRLRLRLRLRR-NH<sub>2</sub> est assemblé sur phase solide en utilisant un protocole Fmoc-tBu. L'ornitine introduite sous forme Fmoc-Orn(Fmoc)-OH est débloquée par traitement du peptidyl-résine à la pipéridine (20% dans Diméthylformamide DMF). Après rinçage par DMF la résine est

incubée 2 fois 30 min dans DMF contenant 6 équivalents de DIEA (Diisopropylamine) et 6 équivalents de Chlorure d'acide palmitique. Le peptide est ensuite clivé/déprotégé 3 heures dans TFA/H<sub>2</sub>O/Phénol/Triisopropylsilane 86/5/5/4. Le peptide Palm-Orn(Palm)-Ahx-RLLRRLRLRLRLRR-NH<sub>2</sub> est ensuite purifié par une série de précipitations successives, suivi d'une chromatographie d'exclusion, puis lyophilisé.

## 2) Oligonucléotide.

Un oligonucléotide couplé à la fluorescéine (Fluo) de PM 6154 et de séquence SEQ ID NO.3 dans la liste de séquences en annexe suivante a été utilisé :

GTG CCG GGG TCT TCG GGC — Fluo

## 3) Gel de retardement.

Un microgramme d'ADN plasmidique, contenant le gène reporter Luciferase, est incubé pendant 45 min avec des concentrations croissantes de peptide dans 100 µl de milieu Optimem afin de former un complexe peptide-DNA. Vingt microlitres de chaque complexe sont ensuite analysés par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% préparé dans un tampon TBE. Après électrophorèse, l'ADN coloré au bromure d'éthidium est visualisé en UV.

## 4) Transfection de l'ADN plasmidique.

L'agent transfectant DMR1E ou des quantités croissantes de peptide sont rajoutés au plasmide (1 µg) dans du DMSO. Après 45 min d'incubation, 300 µl de milieu Optimem sont rajoutés et le tout est étalé dans des plaques à 12 puits. Les cellules K562 sont rajoutées aux plaques à une densité de  $7.10^5$  cellules/puits et le tout est incubé pendant 4 heures à 37°C. Après incubation, 3 ml de milieu RPMI contenant 12,5% sérum de veau fœtal sont rajoutés et l'incubation est poursuivie pendant 48 heures. Les cellules sont centrifugées, lavées et incubées avec un tampon de



lyse. Après centrifugation, le surnageant est testé pour l'activité luciférase en utilisant le test Promega Luciferase Assay System.

5                    5) Transfection des oligonucléotides.

Des quantités croissantes de peptides sont rajoutées à l'oligonucléotide marqué au fluorochrome FITC (1 µg) dans du PBS. Après 30 minutes d'incubation sous la hotte, le mélange est rajouté aux cellules K562 dans 500 µl de milieu Optimem et le tout est incubé pendant 1 heure sous l'étuve à 37°C. Après l'incubation, les cellules sont centrifugées, lavées et ensuite resuspendues dans 0,5 ml de PBS froid. La transfection de l'oligonucléotide a été ensuite analysée par cytométrie de flux (FACS). L'oligonucléotide étant couplé au FITC, l'acquisition se fait à l'aide du filtre FL1H (525 nm). Un histogramme de l'intensité de fluorescence (pour  $1 \times 10^4$  cellules) est obtenu et la moyenne de distribution était considérée comme représentative de la quantité d'oligonucléotide associé aux cellules.

II - Résultats.

25                    1) Capacité des peptides à condenser l'ADN plasmidique.

Dans un premier temps, la capacité des peptides à condenser l'ADN plasmidique a été testée.

Des concentrations croissantes de peptides ont été incubées avec l'ADN et le complexe a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%.

La Figure 1 représente les migrations obtenues sur un gel de retardement, en fonction de la quantité de peptide de transfection. L'incubation avec 0,32 nmoles (0,7 µg) de peptide entraîne un retardement de la migration de l'ADN et l'addition de 0,8 nmoles (1,75 µg) stoppe complètement sa migration..

2) Capacité des peptides à transférer l'ADN plasmidique dans les cellules K562.

5 Dans un second temps, la capacité de ces peptides à transférer l'ADN plasmidique dans les cellules K562 a été testée. Le tableau 2 ci-dessous rapporte l'efficacité de transfection mesurée en fonction du rapport de charges. L'efficacité de transfection du peptide 1 a été également comparée avec celle du DMRIE qui est un agent  
0 transfectant commercial.

Tableau 2

Produit	Peptide (µg)	ADN (µg)	Ratio charges +/-	%
DMRIE	-	1	-	100
Peptide 1	6,65	1	7	1
	5,70	1	6	2
	4,75	1	5	10
	3,8	1	4	5

5 L'efficacité de transfection la plus importante est observée lorsque l'on a un excès de l'ordre de 5 de charges neutralisantes peptidiques (charges positives) par rapport à l'ADN (charges négatives). Ces résultats confirment que le transfert du gène n'intervient qu'en présence d'un excès de charges positives. Le rapport de  
0 charges 5 correspond à une concentration de 1 µg de plasmide pour 4,75 µg de peptide.

Afin d'améliorer le rendement de transfection, une chaîne de poly-lysine ou deux chaînes d'un acide gras (palmitoyl) a été couplée au peptide l'invention. Comme le  
5 montre le tableau 3 ci-dessous, l'addition de ces chaînes au peptide 1 permet une meilleure condensation de l'ADN plasmidique ainsi qu'une meilleure interaction avec la membrane cellulaire. Deux peptides ont été donc

synthétisés : Peptide 2 contenant la poly-L-lysine et Peptide 3 contenant deux palmitoyls.

Tableau 3

Produit	Peptide (µg)	DNA (µg)	Ratio charges +/-	%
DMRIE	-	1	-	100
Peptide 1	6,65	1	7	1
	5,70	1	6	2
	4,75	1	5	10
	3,8	1	4	5
Peptide 2	3,92	1	7	38
	3,36	1	6	23
	2,8	1	5	54
	2,24	1	4	17
Peptide 3	7,63	1	7	52
	6,54	1	6	17
	5,45	1	5	24
	4,36	1	4	6

5 Il ressort de ces expériences que l'addition d'une queue de poly-Lysine ou de deux chaînes d'acide gras comme le palmitoyl au N-terminal du peptide améliore de façon significative le transfert du plasmide.

### 10 3) Transfert d'oligonucléotides.

La capacité de ces peptides pour le transfert de petites séquences d'acides nucléiques tels que les oligonucléotides a ensuite été testée. Les peptides ont été incubés avec l'oligonucléotide de séquence SEQ ID NO.3 et le transfert à travers la cellule a été mesuré par cytométrie de flux. L'oligonucléotide était fluorescent, le pourcentage de cellules transfectées, c'est-à-dire celles qui contiennent de la fluorescence, a été mesuré.

Les résultats du tableau 4 ci-dessous montrent que l'oligonucléotide seul ne peut pas transfecter les cellules. Par contre, l'addition du peptide 1 résulte en une augmentation significative de cellules transfectées. Cette augmentation est proportionnelle au rapport de charges. Ainsi pour un rapport de charge de 30, environ 24% de cellules étaient transfectées par l'oligonucléotide. Comme observé auparavant pour l'ADN plasmidique, l'addition d'une queue de poly-L-lysine au peptide (Peptide 2) ou de deux chaînes d'acide gras (Peptide 3) permet d'améliorer encore plus la transfection. Ainsi, à tous les rapports de charge utilisés, plus de 90 % de cellules ont été transfectées.

Tableau 4

Peptide	Peptide ( $\mu$ g)	Oligo ( $\mu$ g)	Ratio Charge +/-	% de cellules transfectées
aucun		1	-	0
DMRIE	-	1	-	89
Peptide 1	13	1	30	24
	11	1	25	23
	9	1	20	12
Peptide 2	20,8	1	30	96
	17,3	1	25	97
	14	1	20	90
Peptide 3	20,8	1	30	97
	17,3	1	25	95
	14	1	20	78

Dans le tableau 4 ci-dessus :

1  $\mu$ g oligo = 0,00018  $\mu$ mole

Rapport 20 = 0,0036  $\mu$ mole de peptide

Rapport 25 = 0,0045  $\mu$ mole de peptide

Rapport 30 = 0,0054  $\mu$ mole de peptide

## REVENDICATIONS

1) Peptide capable de transférer une substance d'intérêt portant des charges négatives à l'intérieur des cellules et/ou à l'intérieur du noyau des cellules, caractérisé en ce que ledit peptide répond à la formule suivante :

$(\text{RLLR})_p(\text{L})_n(\text{R})_n$ , dans laquelle :

L représente la leucine,

R représente l'arginine,

p est un nombre entier compris entre 2 et 4,

n est 1 ou 2.

2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond à la formule suivante représentée dans la liste de séquence en annexe sous le numéro SEQ ID NO.1 : RLLRRLRLRLRLRR.

3) Vecteur capable de transporter une substance d'intérêt portant des charges négatives à l'intérieur des cellules et/ou à l'intérieur du noyau des cellules, caractérisé en ce qu'il est constitué d'au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 couplé à au moins un composé présentant une affinité pour les membranes cellulaires ou capable de condenser la substance d'intérêt portant des charges négatives.

4) Vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le composé capable de condenser une substance d'intérêt portant des charges négatives est un groupe polylysine comprenant environ au moins 5 et jusqu'à 25 résidus de lysine.

5) Vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le composé présentant une affinité

pour les membranes cellulaires est une chaîne d'acide gras saturé ou insaturé.

5                   6) Vecteur selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisé en ce que le groupe polylysine ou les composés acides gras sont couplés à l'extrémité N ou C-terminale du peptide, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras de liaison.

10                   7) Composition comprenant un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2 ou un vecteur selon l'une quelconque des revendications 3 à 6 et une substance d'intérêt portant des charges négatives.

15                   8) Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que le rapport :

Charges positives du peptide ou du vecteur

---

20

Charges négatives de la substance d'intérêt  
dans ladite composition, est égal ou supérieur  
à 1.

25                   9) Composition selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que la substance d'intérêt portant des charges négatives est une protéine.

30                   10) Composition selon l'une des revendications 7 ou 8, caractérisée en ce que la substance d'intérêt portant des charges négatives est une molécule d'acide nucléique.

35                   11) Composition selon la revendication 10, caractérisée en ce que la molécule d'acide nucléique est de l'ADN.

- 5                   12) Composition selon la revendication 10, caractérisée en ce que la molécule d'acide nucléique est de l'ARN.
- 13) Composition selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisée en ce que la molécule d'acide nucléique est un plasmide.
- .0                   14) Composition selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que la molécule d'acide nucléique est un oligonucléotide.

1/1

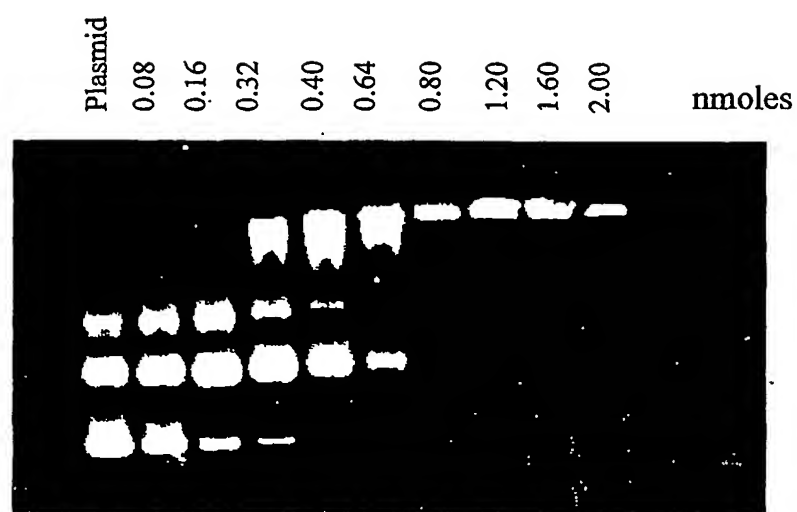


Figure unique



## SEQUENCE LISTING

1

&lt;110&gt; SYNT-EM

&lt;120&gt; Peptides amphipathiques et leur utilisation pour le transfert de substances d'intérêt dans les cellules

&lt;130&gt; 10261PCT

&lt;140&gt; PCT/FR02/XXXXXX

&lt;141&gt; 2002-01-03

&lt;150&gt; FR01/00043

&lt;151&gt; 2001-01-03

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; unidentified

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTIDE

&lt;222&gt; (1)..(16)

&lt;223&gt; Peptide N°1

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTIDE

&lt;222&gt; (1)..(16)

&lt;223&gt; Peptide N°3 = peptide avec deux chaînes d'acides gras (palmitoyl) ajoutées en N-terminal

&lt;400&gt; 1

Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg
1			5				10					15			

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; unidentified

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; PEPTIDE

&lt;222&gt; (1)..(25)

&lt;223&gt; Peptide N°2

&lt;400&gt; 2

Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu
1				5					10					15	

Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Leu	Leu	Arg	Arg
				20			25	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; unidentified

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(18)

&lt;223&gt; Oligonucléotide couplé à la fluorescéine de PM 6154

&lt;400&gt; 3

gtgccggggt cttcgggc